

- 18 Shen Xun, Tian Jingdong, Li Xingyuan *et al.* Biophysical Chemistry, 1991; **40**: 161
- 19 Driomina E S, Sharov V S, Vladimirov Y A. Free Radical Biology and Medicine, 1993; **15**: 239
- 20 Draper H H, Hadley M. Meth Enzymol, 1990; **186**: 421
- 21 Holley A E, Walker M K, Cheeseman K H *et al.* Free Radical Biology and Medicine, 1993; **15**: 231

A Review of the Method in Measuring Lipid Peroxidation in Biological Systems . Tang

Lixia . Shen Xun (*Institute of Biophysics , Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

Abstract To study the reaction mechanism of

lipid peroxidation, methodology is of critical importance. Many methods have been used to measure lipid peroxidation in biological systems, but every one has some advantage and also some disadvantage in different experiments. Recently people often use some advanced methods, such as high-performance liquid chromatography (HPLC), chemiluminescence and so on.

Key words biological systems, lipid peroxidation, measuring method

绿脓杆菌外毒素 A 的结构、功能及其重组毒素

杜世或

(黑龙江省科学院应用微生物研究所, 哈尔滨 150010)

摘要 绿脓杆菌外毒素 A 有三个结构功能区, 氨基端区 (I) 通过关键位点 Lys57 结合靶细胞表面受体, 中心区 (II) 负责该毒素的跨膜转位功能, Arg276 和 Arg279 是关键位点, 在胞吞泡内此毒素于 Arg279 与 Gly280 间酶解成 28 000 和 37 000 两片段, 羧基端区 (III) 所在的 37 000 片段由其末端氨基酸序列 REDLK 介导到内质网再转位入胞浆通过 Glu553 位点结合 NAD⁺ 使延伸因子-2 受 ADP-核糖基化而抑制细胞蛋白质合成导致细胞死亡, 改造的毒素基因同识别蛋白基因融合成的重组毒素有应用前景。

关键词 绿脓杆菌外毒素 A, 免疫毒素, 重组毒素

绿脓杆菌外毒素 A (*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, PE)、白喉毒素 (diphtheria toxin, DT) 和蓖麻毒素 (ricin) 等某些微生物和植物毒素在导向治疗上的应用潜力正刺激着对这些毒素的分子结构和功能的研究。PE 是由机会病原菌绿脓杆菌以无活性的酶原形式分泌到胞外的毒素, 酶原必须经历结构修饰才能呈现 ADP-核糖基转移酶及相伴的 NAD 糖苷水解酶活性。PE 同白喉毒素、蓖麻毒素一样, 是有效的细胞杀伤剂, 只要一个毒素分子进入细胞浆就足以杀死细胞, 它对若干种动物有致死作用。PE 的毒性本质是它催化真核细胞的延伸因子-2 (elongation factor-2, EF-2) 的

ADP-核糖基化、阻止肽链延长、中断细胞蛋白质合成而行使细胞毒作用。近年一个很重要的进展是搞清了 PE 的三维结构, 即 Allured 及其同工者^[1]提出了 PE 酶原的分子模型; 同时, PE 结构基因业已克隆和序列分析, 这些成果进而促进了 PE 的细胞毒作用机理及其嵌合毒素应用的研究^[2]。

1 PE 的基本结构与细胞毒作用

Allured 等人^[1]对 PE 晶体的 X 线衍射分析表明 PE 是 613 肽的单链毒素蛋白, 分子量

66 000, 它的三维结构由三个结构功能区构成. 区 I 在 PE 分子的氨基端 (N 端), 占分子的 $\frac{1}{3}$ 强, 呈反向平行的 β 结构. 区 I 又分为大区 (I_a) 和小区 (I_b), 这两部分在 DNA 序列上是分离的, 但在三维结构中紧靠在一起. 区 I_a 含第 1—252 位氨基酸, 区 I_b 含第 365—404 (现指第 365—399^[2]) 位氨基酸. 区 II 为中央区, 包括第 253—364 位氨基酸, 有 6 个连续的 α 螺旋. 区 III 为羧基端 (C 端) 区, 占分子的 $\frac{1}{3}$, 包括第 405—613 (现指第 400—613^[2]) 位氨基酸. 此毒素分子结构中含有 8 个半胱氨酸, 形成 4 个双硫键, 它们是三级结构中形成折叠的决定因素.

PE 结构功能的特点在于它与含功能相佐的 A, B 双链的 DT 等毒素不同, 它的三个结构功能区在单一肽链上行使其细胞毒性所必需的细胞结合、转位和 ADP-核糖基化这三种功能. 区 I_a 负责与靶细胞表面受体结合——细胞结合功能; 区 II 负责毒素跨膜转位功能; 区 III 负责 ADP-核糖基化作用——酶催化功能. 近来的研究表明, 细胞毒作用有相当复杂的功能格局^[2]. 起初, PE 通过它的 N 端 (区 I_a) 结合到细胞表面特异的毒素受体上; 然后, 毒素-受体复合物经膜凹窝 (coated pit) 内陷进入胞吞泡 (endocytic vesicle); 泡内质子泵迅速使泡内酸化, 低 pH 环境引起毒素伸展而易受细胞蛋白酶裂解; 裂解发生在 Arg279 与 Gly280 位点之间^[3], 接着, 联系这两部分的二硫键 (Cys265—287) 再通过还原作用断开, 产生 N 端 28 000 和 C 端 37 000 的两个优势片段. 前者含区 II 之小部和区 I, 进一步降解时产生 25 000 和 18 000 两片段; 后者 (37 000 片段) 较稳定, 含区 II 之大部和区 III, 它横跨膜转运到高尔基器, 再经 Shuttle 泡到达内质网, 它是由 C 末端特异的氨基酸序列 REDLK 介导到内质网的, 进而转位入胞浆. 正是这个 37 000 片段催化自 NAD^+ 之 ADP-核糖部分转移到靶底物 EF-2 所受修饰的组氨酸残基上使之受 ADP-核糖基化作用, 使 EF-2 灭活, 蛋白质合成中断而导致细胞死亡.

2 PE 结构与功能的关系

探知各区的功能及分析各区结构与功能的关系主要根据 PE 基因突变的研究.

区 I_a 行使识别和结合靶细胞表面受体的功能, 惟 PE 受体的生化本质尚不清. 区 I_a 的缺失产生了分子量 40 000 的 PE40, 它保留了完整的 ADP-核糖基化功能, 但细胞毒性减低到 1%, 这是由于 PE40 丧失细胞结合能力的结果^[4]. 区 I_a 的 12 个赖氨酸能同 2-亚氨基噻吩反应而使 PE 受修饰, 可导致 PE 细胞毒性减低, 但 ADP-核糖基化活性并没减低, 说明区 III 功能仍然保留完好. 缺失区 I_a 的 PE 或受 2-亚氨基噻吩修饰了的 PE 也保留着区 I_b 之转位功能, 因为它们同上皮生长因子等细胞识别成分相偶联时恢复了细胞杀伤作用.

对区 I_a 的定点诱变研究发现, 当将第 57 位赖氨酸 (Lys57) 诱变为谷氨酸 (Glu) 时, 突变的 PE 细胞毒性减低到 1%, 这是由于突变毒素同靶细胞表面结合能力丧失的缘故. 同时已观察到 Lys57 位于 PE 分子表面, 这与其有受体结合能力是相符合的. 区 I_a 上其它 Lys 位点的突变对 PE 细胞毒作用无任何影响. 可见, Lys57 是区 I_a 的关键的氨基酸位点^[5]. 除 Lys57 外, 位于区 I_a 的 His246, Arg247 和 His249 三个碱性氨基酸也是维持 PE 生物学活性的重要位点. 在突变型 PEGlu246, 247, 249 和 PE Glu57, 246, 247, 249, 上述碱性氨基酸已由 Glu 替换, 使区 I_a 与区 II 间连接的氢键受阻断, 突变型分子比天然 PE 较为伸展, 增加了对蛋白酶的敏感性, 缩短了在小鼠体内循环的半衰期, 因此, 它们对动物显示低的细胞毒性^[6].

区 I_b 在三维结构上位于区 I_a 和区 III 之间, 此区的大部 (第 365—381 位氨基酸) 缺失并不影响 PE 的生物学活性. 区 I_b 的确切功能尚不清楚.

区 II 在毒素跨膜转位过程中起主导作用. 当区 II 缺失时, 尽管其细胞结合能力和 ADP-核糖基化活性尚存, 但细胞毒性丧失, 说明区

II 为毒素转位功能所必需. 区 II 的螺旋插入膜或横跨膜是转位过程的重要环节. A 与 B 螺旋之间有一个环位于分子表面, Arg276 和 Arg279 在此环上, 细胞蛋白酶裂解作用发生在第 279 和第 280 位氨基酸之间. 试验表明, Arg276 向 Gly 的点突变造成 PE 分子完全丧失细胞毒性, Arg279 向 Gly 的点突变引起细胞毒作用减低到 $1/400^{[7]}$. 因为突变分子对细胞蛋白酶有抗力, 因而不能裂解产生 37 000 片段, 毒素不能转位入胞浆而不产生细胞毒作用. 研究发现 Arg276 不可用大小相近和荷电相同的氨基酸替换, 说明此位点与细胞有关成分的相互作用是专一的. 可见, Arg276 和 Arg279 是维持区 II 转位功能的关键性位点. 其他重要的氨基酸位点有 Cys265, Cys287 等, 它们向 Ser 或 Ala 的点突变造成细胞毒作用减低到 $1/10^{[8]}$.

此外已观察到, 区 II E 螺旋的部分 (第 346—364 位氨基酸) 缺失不引起 PE 活性的丧失. 近来研究表明, 天然的 PE 分子结构紧密, 对蛋白酶有一定的抵抗力. 区 II 表面的 27 个氨基酸分别以 Ala 取代后会引引起分子伸展, 改变了对蛋白酶的敏感性. 这些氨基酸对 PE 的细胞毒性、分子的适当折叠及分泌入周质都是重要的^[9].

区 III 有两个功能, 其一是催化 EF-2 受 ADP-核糖基化作用, 其二是它的 C 末端特异的氨基酸序列引导毒素的 37 000 片段进内质网. 缺失定位研究表明, 摘除第 401 位之前的所有氨基酸残基导致保留一个有完整 ADP-核糖基化活性的蛋白, 可以明确界定第 400—600 位氨基酸为 PE 的 ADP-核糖基化活性所必需^[8]. Allured 提出区 III 的一个裂缝区是酶活性中心. 现已证实, 定位在裂缝区的 Glu553 是关键的活性位点, Glu553 参与结合 NAD 的过程, Glu553 向 Asp 的点突变导致其 ADP-核糖基化活性至少减低到 1%^[10], 缺失它则完全丧失活性. 其他几个定位在裂缝区的残基 Arg458, Arg467 及 Trp466 参与区 III 同 NAD 相互作用的过程; Tyr481 以 Phe 替代时引起

ADP-核糖基转移酶活性减低却不减低 NAD 糖苷水解酶活性而被推测参与同 EF-2 相互作用; Trp558 也不直接参与结合 NAD 的过程却为 ADP-核糖基化作用所必需. 区 III 的另一个关键残基 His426 位于由第 421—432 位氨基酸残基构成的 α 螺旋内, 此螺旋位于酶催化作用中心的远端. 在 His426 位突变的 PE 其 ADP-核糖基转移酶活性降落到天然型的 0.002%—28%, 其 NAD 糖苷水解酶活性落到 1% 以下. His426 在区 III 酶催化位点的分子构筑上起关键作用^[11]. 区 III 表面 Arg490 附近是另一处蛋白酶靶区. Arg490 的缺失或用 Ser 和 Lys 取代 Arg490 和 Arg492 导致产生耐蛋白酶的分子, 它有正常的细胞毒性, 但在小鼠血液中的半衰期明显延长. Arg492 的缺失或第 486—491 位氨基酸用三个 Gly 替代则显著引起 ADP-核糖基化活性减低, 这表明此段残基对酶催化作用也是重要的^[6].

区 III C 末端特异的氨基酸序列介导 PE 由胞吞泡向内质网的转位过程. 此特异序列是 Arg609-Glu610-Asp611-Leu612-Lys613 (即 REDLK) 五个氨基酸残基片段. 它的缺失使 PE 的细胞毒性丧失, 但对其 ADP-核糖基化活性并无任何影响. 其中, Lys613 的缺失对 PE 活性不产生任何影响, 但 Leu612 或其余氨基酸的缺失会极大地减低其细胞毒性. 只有 C 末端特异的 REDL (K) 序列完整时 37 000 片段的转位才能实现. 假如此序列被跳越、缺失或被遮闭, 那么 37 000 片段则不能转位入胞浆, 也就不能产生细胞毒作用. 在活性 PE 分子的 C 末端特异序列 REDLK 和使蛋白质在内质网滞留序列 KDEL 之间有功能相似性. 当编码 PE 的 C 末端 REDLK 序列以 KDEL 或 (KDEL)₃ 片段取代时导致其细胞毒性提高 2—8 倍, KDEL 序列使 PE 转位作用更为有效^[12].

3 PE 构建的重组免疫毒素

用于导向治疗的免疫毒素是由同靶细胞表面受体有专一亲合性的配基或抗体分子作导向

成分(毒素载体)与具有细胞毒作用的毒素分子相偶联成的嵌合分子。有特异性细胞识别能力的载体将毒素携带到靶细胞表面,通过受体介导的胞吞作用(endocytosis)进入细胞发挥细胞毒作用,从而能选择性地杀伤靶细胞。起初的嵌合毒素是采用化学偶联法(二硫键或硫醚键)将毒素分子与毒素载体相连接的。但是,化学偶联法制备步骤复杂,收率低;此类偶联物分子量大,对靶细胞渗透性差,免疫原性也强;而且在体内易降解,稳定性差;化学偶联有时也易造成空间位阻影响偶联物的生物活性。近几年,随着基因工程技术的飞速发展,新型的嵌合毒素是采用DNA重组技术,通过克隆、改造毒素基因再和与细胞表面受体特异性结合的配基或抗体的基因片段重组后构成单

一分子编码顺序而表达产生的,有利于克服化学交联法的缺点。由于PE有集细胞结合、转位、酶活性三种功能于单一肽链的结构特点,它比其他毒素适合通过基因改造实现这些要求。特别是PE40或PE66^{4Glu}(即PEGlu57, 246, 247, 249)更适合构建理想的嵌合物。PE基因改造去除了编码细胞结合区I₁的DNA或改造其关键位点,排除了基因产物对细胞的非特异性结合,以便再将导向目的不同的特异细胞识别成分的基因与之相融合。以Pastan为首的美国国立卫生研究院(NIH)癌症研究所分子生物学实验室近年在这方面从不同角度开展了工作,取得了优异成果,有的嵌合毒素已进入临床试验。由PE基因改造物构建的重组嵌合毒素列入表1。

表1 由PE基因改造物重组的嵌合毒素

免疫毒素	靶和靶细胞	动物试验 (鼠体内)	临床试验	文献
TGF α -PE40	EGF受体 上皮细胞癌 腺细胞癌 平滑肌细胞	皮下肿瘤、上皮癌和前列腺癌消退	人膀胱癌	13
HB-TGF α -PE38	EGF受体 增殖的血管平滑肌细胞			14
IL ₂ -PE40	IL ₂ 受体 T细胞白血病	淋巴瘤消退 抑制自身免疫性关节炎 同种异体移植物存活		15
IL ₂ -PE66 ^{4Glu}	IL ₂ 受体 激活的人T细胞	活性高于IL ₂ -PE40		15
IL ₆ -PE40	IL ₆ 受体 骨髓瘤 肝癌 前列腺	肝癌		16
IL ₆ -PE66 ^{4Glu}	IL ₆ 受体	活性高于IL ₆ -PE40		16
CD4 (178) -PE40	感染了HIV的细胞 gp120糖蛋白		AIDS	17
Anti-T _{ac} (FV) -PE40	人IL ₂ 受体 白血病			18
B3 (FV) -PE40 和 B3 (FV) -PE38KDEL	多种癌细胞 B3抗原	人上皮癌和腺细胞癌的消退		19
PR1 (FV) -PE38KDEL	前列腺癌细胞 PR1抗原			20

当融合这些嵌合毒素时,须注意把导向成分的基因 cDNA 位于编码 PE40 的 DNA 5' 端^[13-20],若位于其 3' 端则表达的蛋白无细胞杀伤作用或杀伤力弱.研究发现, TGF- α 连在 PE40 N 端的嵌合毒素 TGF α -PE40,其活性比连在 PE40 C 端的嵌合毒素 PE40-TGF α 高 10 倍;对比所构建的 IL₂-PE40 和 PE40-IL₂ 时发现只 IL₂-PE40 有细胞毒作用.构建其他与 PE40 相关的嵌合毒素时也有同样的现象,因为导向成分若加在区 III 的 C 端则引起 REDLK 序列不能呈现正常功能,造成此型嵌合分子转位困难.因此在构建重组毒素时须注意保持 C 末端 REDLK 序列的功能.此外,正如前述,用内质网滞留序列 KDEL 代替 REDLK 序列会提高嵌合毒素的细胞毒作用.

由于抗体的抗原结合位点由轻链和重链两个肽链的可变区 (V_L, V_H) 组成,因此,为重组一个单链免疫毒素所要装配的质粒须含编码抗体 V_H 和 V_L 的 DNA 片段,而且在这两个 DNA 片段之间以一小肽 (15 个氨基酸) 的 DNA 片段将两者连接在一起,然后再与 PE40 等基因相融合^[2].有的融合毒素在导向的载体与 PE 毒素间也借助一个肽连接物.

这些嵌合成的杂交基因在 *E. coli* 中表达,杂交毒素蛋白以细胞质包涵体形式累积并以浓缩形式分泌入周质,包涵体往往含有相当纯的重组毒素蛋白,易纯化,并能重新折叠成活性蛋白.要想充分实现这些基因融合毒素杀伤靶细胞的完整功能,分子适当折叠是必要的. PE 及其几个单链免疫毒素变异型的各功能实体区各自以不同的动力学进行折叠,在抗体 (载体) 区与 PE 毒素间的肽连接物的变异也影响重组毒素折叠的动力学、聚焦倾向性及其有活性的折叠分子的产量^[19].

研究这些重组毒素的重要目的是用于人和动物疾病的导向治疗. 疾病细胞或诱起疾病的细胞可作为这些嵌合毒素的靶细胞而被杀死. 重组免疫毒素在癌症、爱滋病等人类目前尚无可靠的治疗手段的疾病治疗上潜藏着诱人的应用前景. 现有的工作给人以启迪和鼓舞,研究

者们正试图攻克所存在的诸多难题把导向药物研究推向新阶段.

参 考 文 献

- 1 Allured V S, Collier R J, Carroll S F *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1986; **83**: 1320
- 2 Pastan I, Chaudhary V, FitzGerald D J. Annu Rev Biochem, 1992; **61**: 331
- 3 Ogata M, Fryling C M, Pastan I *et al.* J Biol Chem, 1992; **267**: 25396
- 4 Hwang J, FitzGerald D J, Adhya S *et al.* Cell, 1987; **48**: 129
- 5 Jinno Y, Chaudhary V K, Kendo T *et al.* J Biol Chem, 1988; **163**: 13203
- 6 Brinkmann U, Pai L H, FitzGerald D J *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; **89**: 3065
- 7 Jinno Y, Ogata M, Chaudhary V K *et al.* J Biol Chem, 1989; **264**: 15953
- 8 Siegall C B, Chaudhary V K, FitzGerald D J *et al.* J Biol Chem, 1989; **264**: 14256
- 9 Kasturi S, Kihara A, FitzGerald D J *et al.* J Biol Chem, 1992; **267**: 23427
- 10 Douglas C M, Collier R J. J Bacteriol, 1987; **169**: 4967
- 11 Wick M J, Cook J M, Iglewski B H. Infect Immun, 1992; **60**: 1128
- 12 Seetharam S, Chaudhary V K, FitzGerald D J *et al.* J Biol Chem, 1991; **266**: 17376
- 13 Pai L H, Gallo M G, FitzGerald D J *et al.* Cancer Res, 1991; **51**: 2808
- 14 Mesri E A, Kreitman R J, Fu Y *et al.* J Biol Chem, 1993; **268**: 4853
- 15 Lorberboum-Galski H, Garsia R J, Gately M *et al.* J Biol Chem, 1990; **265**: 16311
- 16 Siegall C B, FitzGerald D J, Pastan I. J Biol Chem, 1990; **265**: 16318
- 17 Chaudhary V K, Mizukami T, Fuerst T R *et al.* Nature, 1988; **335**: 369
- 18 Batra J K, FitzGerald D, Gately M *et al.* J Biol Chem, 1990; **265**: 15198
- 19 Brinkmann U, Buchner J, Pastan I. Proc Natl Acad Sci USA, 1992; **89**: 3075
- 20 Brinkmann U, Gallo M, Brinkmann E *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 547

Structure and Function of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A and Its Recombinant Toxin.

Du Shiyu (Institute of Applied Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150010, China).

Abstract *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A (PE) contains three structure function domains. The amino-terminal domain I is involved in binding to target cell-surface receptors through the active site Lys57. The central domain II is responsible for the translocation of PE across membranes. Arg276 and Arg279 are the active key positions of the domain II. The protease cleaves PE between Arg279 and Gly280 into 28 000 and 37 000

fragments. The carboxyl-terminal domain III is located in 37 000 fragment which is directed by the REDLK sequence at the carboxyl end of domain III to the endoplasmic reticulum and translocated to the cytosol, and then ADP-ribosylates the EF-2 (elongation factor 2) by binding NAD^+ through the key site Glu553 to result in the inhibition of cell protein synthesis and death of target cells. It is a practical prospect that the recombinant immunotoxins are made by fusing DNA fragments encoding recognition proteins to the modified PE genes.

Key words *pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, immunotoxin, recombinant toxin

菌紫质光生物分子器件及其超快过程*

姚保利 徐大纶

(中国科学院西安光学精密机械研究所瞬态光学技术国家重点实验室, 西安 710068)

摘要 菌紫质是嗜盐菌紫膜中的一种光能转换蛋白. 它具有光致色变和光驱动质子泵功能, 其原初光异构化过程极其迅速, 可在 430fs 内完成. 由于菌紫质具有一系列独特的光电和光学特性, 如对光强的微分响应, 高的空间分辨率, 高的光灵敏度, 高循环次数等, 使得它在光电探测, 仿视觉系统, 人工神经网络, 非线性光学及光学信息记录和处理方面有很多重要应用. 利用超短脉冲激光技术, 高时间分辨光谱学技术及高速取样探测技术, 对菌紫质的光循环, 原初光异构化, 激发态动力学, 质子泵机制等方面的研究已取得了许多有意义的结果.

关键词 菌紫质, 生物分子器件, 超快过程

本世纪 60 年代末发现了一种在结构上与动物视网膜上的视色素——视紫红质 (rhodopsin) 非常相似的光敏蛋白——细菌视紫红质 (bacteriorhodopsin, bR) 或称菌紫质. 它存在于嗜盐菌 (*Halobacterium halobium*) 紫膜 (purple membrane) 中. 由于 bR 具有光驱动质子泵功能, 能直接利用光能实现质子跨膜运输, 形成重要的质子电化学梯度, 其原初光异构化过程极其迅速, 可在 430fs 内完成. 它

又具有高空间分辨率 ($>5000\text{lines/mm}$) 和光灵敏度 (10^{-3}J/cm^2) 及高循环次数 ($>10^5$ 次), 再加上它性能比较稳定, 利用先进的基因工程与生化手段, 可获得性能优良的 bR 变种. 因而近年来对菌紫质光生物分子器件及其超快过程的研究, 取得了许多重要的成果, 本文就是这方面国内外研究的一个综述和分析.

*瞬态光学技术国家重点实验室基金资助项目.

收稿日期: 1994-04-06, 修回日期: 1994-07-04